平成 **19** 年度成果報告

知的基盤創成・利用促進研究開発事業

臨床検査用標準物質の研究開発

平成 **20** 年 **5** 月

（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構

委託先　（独）産業技術総合研究所

はしがき

本研究は平成 17～19 年度の間に（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）「知的基盤創成・利用促進研究開発事業」の委託事業として実施したものである。

臨床検査は一般的な健康診断や病院での初期診断検査として国民の関心が高い分野であり、特に最近ではメタボリックシンドローム（代謝症候群）診断が国民的な関心事となり、厚生労働省を中心に当該診断に関する全国統一の指針を策定したところである。なかでも、臨床検査データの標準化は個人の検査データに普遍性を付与し、健康管理データとして継続的な利用を可能にする点から、国民の健康や医療に直接的に貢献する分野である。臨床検査の標準化に関する活動は、これまでにも関係する諸学協会の努力によってさまざまな分野で進められ、臨床検査の進歩に大きな成果を挙げてきた。一方、近年の人的および物的交流、情報交流さらには研究交流がグローバル化することにともない、臨床検査分野においても測定方法や測定結果の標準化が世界的な規模で必要とされるようになった。具体的には、2006 年から EU において体外診断薬に関する指令（In Vitro Diagnostic Medical Devices: IVDMD 指令）が発効され、臨床検査における測定方法の妥当性と測定結果の信頼性の保証、すなわちトレーサビリティの確保が求められる時代へ入った。このため、世界各国の臨床検査関連産業は、臨床検査結果の信頼性と互換性を確保するために自らトレーサビリティを確保するために必要な標準物質を開発するとともに、トレーサビリティソースとして必要な国家計量標準としての標準物質の開発と供給を必要とするようになった。2002 年 6 月には国際度量衡委員会（CIPM）と国際臨床化学連合（IFCC）の合同委員会「検査医学におけるトレーサビリティに関する合同委員会 (Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine: JCTLM)」が設置され、臨床検査分野における純物質系標準物質および高位の実試料系標準物質の整備が欧米日を中心に進められている。

本研究は、上記のような臨床検査に関わる国内的および世界的な潮流のもとで、極めてタイムリーに始められた。本研究では臨床検査に係わる産学官の研究者の参加を得て、初診時に必須な検査項目や臨床側より要望の高い検査項目について、末端ユーザーから高位標準物質までのトレーサビリティ体系を構築することを目的として、実試料系標準物質および純物質系標準物質の研究開発を行っている。同時に、現時点では高位標準物質の開発が難しい項目については、問題点の把握と開発の見通しを得ることを目的として調査研究を行っている。本研究開発により、数量的にも実効的な標準物質を迅速に整備するとともに、臨床の現場から国際単位系にまで遡及できる理想的な臨床検査のトレーサビリティ体系を社会に示すことで、臨床検査分野における計量的な意味での標準化が確立されることを願う次第である。

平成 20 年 5 月

研究代表者　　千葉　光一

（独）産業技術総合研究所　計測標準研究部門

１．事業目的および成果の概要

１－１　事業目的

健康診断や病院などの医療機関で行われる血液や尿等の臨床検査は、個人の健康管理、医学の基礎データ、医学研究の基本情報である。しかしながら、医療計量や医療検査機械システムにより得られる検査データは、測定機器間、測定方法間、検査機関間において相互に互換性が確保されていないのが現実である。このため、診断に用いる臨床検査データの基準値が病院ごとに異なる、あるいは個人の健康診断や臨床検査データの継続性が保てないなどの問題が存在し、膨大な臨床検査データが有効に活用されていないと考えられている。

本研究開発では、医療計量及び医療検査機械システムにおける測定結果を科学的に信頼性のあるものにし、かつ、検査機関間での互換性を持たせるため、基本的な臨床検査項目について高位標準物質から末端の検査機関で用いられる標準物質までのトレーサビリティ体系を構築することを目的とする。

すなわち、臨床検査データに計測科学的な信頼性を付与することにより、検査機関が異なっても測定されるデータの互換性を確保することができるようになる。その結果、臨床検査データの互換性が空間的にも（何処でも）、時間的にも（いつでも）確保できるようになり、測定される臨床検査データに関して、医療の基礎情報としての信頼性が向上し、同時に個人の健康管理データとしての連続性が確保されるようになる。また、検査機関毎のデータに互換性を確保することができることから、臨床検査結果を意味のあるデータ群として集積し、解析することにより有用な情報を得ることができるようになる。上記のようにトレーサビリティが構築されることにより、以下の効果が期待できる。

①１回の検査結果でも、より適切な医療を実現できる。

②個人の長期間の検査データを健康管理や病気の診断等へ活用することができ、個人差を踏まえた適切な健康管理や保健指導及び医療の実現に大きく寄与することができる。

③現在行われている臨床検査の１割以上が不要な重複検査であるといわれているが、それを無くすことができる。

④日本の多くの企業が供給している医療検査機械システム（検査機器及び検査試薬）について世界で信頼を獲得することができ、国際競争力を強化することができる。

⑤本研究開発は、医療分野の研究開発にとって不可欠な検査データや健康状態等に係る日本全体としてのデータベースを構築するための基盤となる。

１－２　事業概要

本研究開発では国際的にも認められる臨床検査用標準物質の開発を目指す。受託研究期間の３年間で 20 種類程度の実試料系標準物質の開発を行う。これらは、初診時に必須な検査項目と内分泌疾患の病態識別、循環器系疾患や糖尿病患者の治療の判断に必須な項目等重要な項目で、いずれも臨床側から早急な標準物質供給が求められているものであり、また、生活習慣病の予防に必要な検査項目の多くをカバーするものである。また、純物質系標準物質に関して、現在、世界的

にみても認証標準物質が開発されていないために、トレーサビリティ体系が確立されていない純物質系タンパク質を中心に、現在供給されているメーカーレベルの標準物質をトレーサビリティの確保された標準物質へ引き上げることを目的に、３種類程度の純物質系標準物質を開発する。

一方、検査項目の中で量的にそのほとんどを占めるが、現時点ではすぐに高位の標準物質開発に着手することが困難な検査項目については、標準物質の候補となる製造業者の校正物質の調査を行い、それらの中から共同実験により標準物質の候補となる校正物質の選定を行う。

研究開始時点で研究開発等を計画した標準物質の項目を表１にまとめた。本研究開発により、初期診療に必要な項目の大部分および臨床側から早急な標準物質の供給が求められている検査項目について標準物質を整備することが出来る。また、一部の項目については、純物質系標準物質を開発することにより、国際単位系にまで遡及できる理想的な臨床検査のトレーサビリティ体系を社会に示すことができる。

計量標準・標準物質の整備は国等により行われているところであるが、特に安全・安心な国民生活の実現に向けた臨床検査分野の計量標準・標準物質に関しては未整備な部分が多く、速やかな整備が求められている。本事業により、計測のトレーサビリティをほとんど認識していなかった臨床検査分野の関係者にその重要性を認識させることができる。

（注）

①標準物質：下位の標準物質や事業者の校正物質に値付けを行うため、または臨床検査実施機関で測定機器の校正のための基準になる物質であり、事業者や臨床検査機関が共通に使用できるもの。

②実試料系標準物質：実際の試料と類似した組成を持ち、その中の成分濃度が決定された標準物質。臨床検査の分野では、血清、血漿、尿などが分析試料であるため、標準物質もこれらの試料をもとに調製される場合が多い。

③純物質系標準物質:確定した純度を有する物質。それらを単純に溶解した標準液もここに含む。

④校正物質：厳密に計量科学的に定義された用語ではないが、ここでは標準物質と区別するために以下のように定義する。メーカーが独自に設定したもので、主に自社の臨床検査機器・試薬の値付けに用いたり、検査機関等で自社の臨床検査薬を使用する際の校正用として供給したりする物質。

表１　本研究で開発する標準物質一覧

		項目	平成17年度	平成18年度	平成19年度
産総研で研究実施	高純度物質系				
		C反応性蛋白(CRP)	→	→	
		アルブミン（ALB）		→	→
		コルチゾール		→	→
	実試料系Ⅰ				
		血液ガス	→	→	
		グルコース(GLU)	→		
		尿酸(UA)	→		
		クレアチニン(CRE)	→		
		コリンエステラーゼ(CHE)	→	→	
		グリコアルブミン（GA）	→	→	→
		イオン化Ca	→	→	
		ヘモグロビンA1c	→	→	→
		総カルシウム（Ca）		→	
		総マグネシウム（Mg）		→	
		血清鉄		→	
		尿素(UN)		→	
		コルチゾール	→	→	→
		インスリン	→	→	→
		C-ペプチド(CPR)	→	→	→
日本臨床検査標準化協議会に委託	実試料系Ⅱ				
		HDL-コレステロール（HDL-C）	→	→	→
		LDL-コレステロール（LDL-C）	→	→	→
		アルブミン二次標準物質	→	→	→
		アルブミン(ALB):尿	→	→	→
		アルブミン(ALB):血清	→	→	→
		膵型アミラーゼ（P-AMY）	→	→	→
		血清CRP標準物質	→	→	→
		リパーゼ	→	→	→
	実試料系標準物質の調査研究項目				
		尿中ナトリウム（Na）	→		
		尿中 カリウム（K）	→		
		尿クロール（CL）	→		
		尿中マグネシウム（Mg）	→		
		尿中 カルシュウム（Ca）	→		
		尿中尿素窒素（UN）	→		
		尿中尿酸（UA）	→		
		尿中 クレアチニン（Cre）	→		
		尿中アミラーゼ（ AMY ）	→		
		尿中グルコース（ GLU）	→		
		尿中無機リン（IP）	→		
		血清無機リン（IP）	→		
		血清PSA	→		
		血清抗核抗体	→		
		血清Li	→		
		ジゴキシン		→	
		テオフィリン		→	
		β２－マイクログロブリン		→	
		エストラジオール		→	
		プロゲステロン		→	
		テストステロン		→	
		甲状腺刺激ホルモン		→	
		サイロキシン		→	
		βヒト絨毛性ゴナドトロピン		→	
		FDP		→	
		Dダイマー		→	
		CEA		→	
		AFP		→	
		CA125		→	
		フェリチン		→	

１－３　成果の概要

初診時に必須な検査項目のうち標準物質が未整備なものや臨床側より要望の高い項目について、末端ユーザーまでのトレーサビリティ構築を念頭に、それぞれ実試料系標準物質および純物質系標準物質の開発・整備を行った。標準化基本検討委員会において全体の統括を行い、開発の方向性についての合意を得た上で、最終的には、国際的にも認められる臨床検査用標準物質の開発を目指した。

（１）「標準化基本検討委員会」

平成 19 年 4 月 23 日と平成 20 年 1 月 17 日に標準化基本検討委員会を開催し、標準物質開発計画、進捗状況、今後の方向性についての協議を行った。

（２）「実試料系標準物質の研究開発」

ヘモグロビン A1c 実試料系標準物質については、4%から 12%の範囲で５濃度レベルのプロトタイプを用いて日常検査法での不確かさの評価実験と、国際的な共同実験による認証値の設定を行い、国際的な JCTLM（国際度量衡委員会の下に設置された臨床検査医学におけるトレーサビリティ合同委員会）データベースにノミネーションした。グリコアルブミン、血清鉄、尿素、コルチゾール、インスリン、C-ペプチド、尿中アミラーゼ、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、血清 C 反応性蛋白(CRP)については実試料系標準物質のプロトタイプを作製し、反応特性と日常検査法との互換性試験を実施し、標準物質に必要な性状を明らかにした。尿中ナトリウム・カリウム・塩素・マグネシウム・カルシウム・尿酸・尿素窒素・クレアチニン・グルコース・無機リン、血清無機リン・リチウムについては、実試料系標準物質候補について標準物質として必要な安定性の評価を行い、尿用標準物質については、標準物質の開発が可能となった。アルブミン、膵型アミラーゼについては実試料系標準物質の値付けを実施した。リパーゼについては、各社試薬での共同実験をもとに、標準物質に必要な特性や調製方法を決定した。

（３）「純物質系標準物質の研究開発」

C 反応性蛋白の純物質系標準物質(標準液)については、値付けを実施し、標準物質供給が可能となった。アルブミンの純物質系標準物質については値付けのための基準測定法を確立した。コルチゾールの純物質系標準物質に関しては、値付けの基準とする高純度標準物質および供給用の候補品の調製方法を決定するとともに、値付けのための測定方法を確立し、目標の不確かさ 1%以内での値付けの見通しを得た。

１－４　目的に照らした達成状況

本年度において実試料系標準物質の開発を予定している血清関連 16 項目の標準物質および尿関連 11 項目の標準物質に関しては、ほぼ予定通り進捗した。ヘモグロビン A1c 実試料系標準物質については、2008 年 4 月に JCTLM（検査医学におけるトレーサビリティに関する合同委員会）データベースへ登録申請をおこなった。さらに、次年度には HDL-および LDL コレステロールおよびグルコアルブミンを JCTLM にノミネーションする予定である。また、当該年度調査研究を行った 27 項目のうち、尿中電解質及び尿中生化学物質標準物質および血清無機リン、リチウムの項目については、平成 17 年度の調査研究の結果から標準物質開発への見通しが得られ、尿用の実試料

系標準物質の開発研究を行ったものである。

純物質系標準物質に関しては、当初開発を計画した 3 項目（C 反応性蛋白、アルブミン、コルチゾール）の標準物質の作製技術を開発した。特に、C 反応性蛋白は認証標準物質の開発を終了し、認証標準物質としての供給を開始した。本標準物質に関しては次年度の JCTLM にノミネーションする予定である。また、アルブミンとコルチゾールに関しては純物質系標準物質の作製方法および値付け方法を開発、純物質系標準物質の製造を可能にした。

なお、実試料系標準物質の調査研究に関しては、平成 17 年度および 18 年度で標準物質が作製可能と判断した項目について、実験計画書および標準物質候補品を作製し、検証実験を行った。このうち E2、LH、FSH、FT4、β２-マイクログロブリンについては、プール血清（抗原未添加）が有効という結果を得た。

２．成果の詳細

２－１　標準化基本検討委員会

２－１－１　目　的

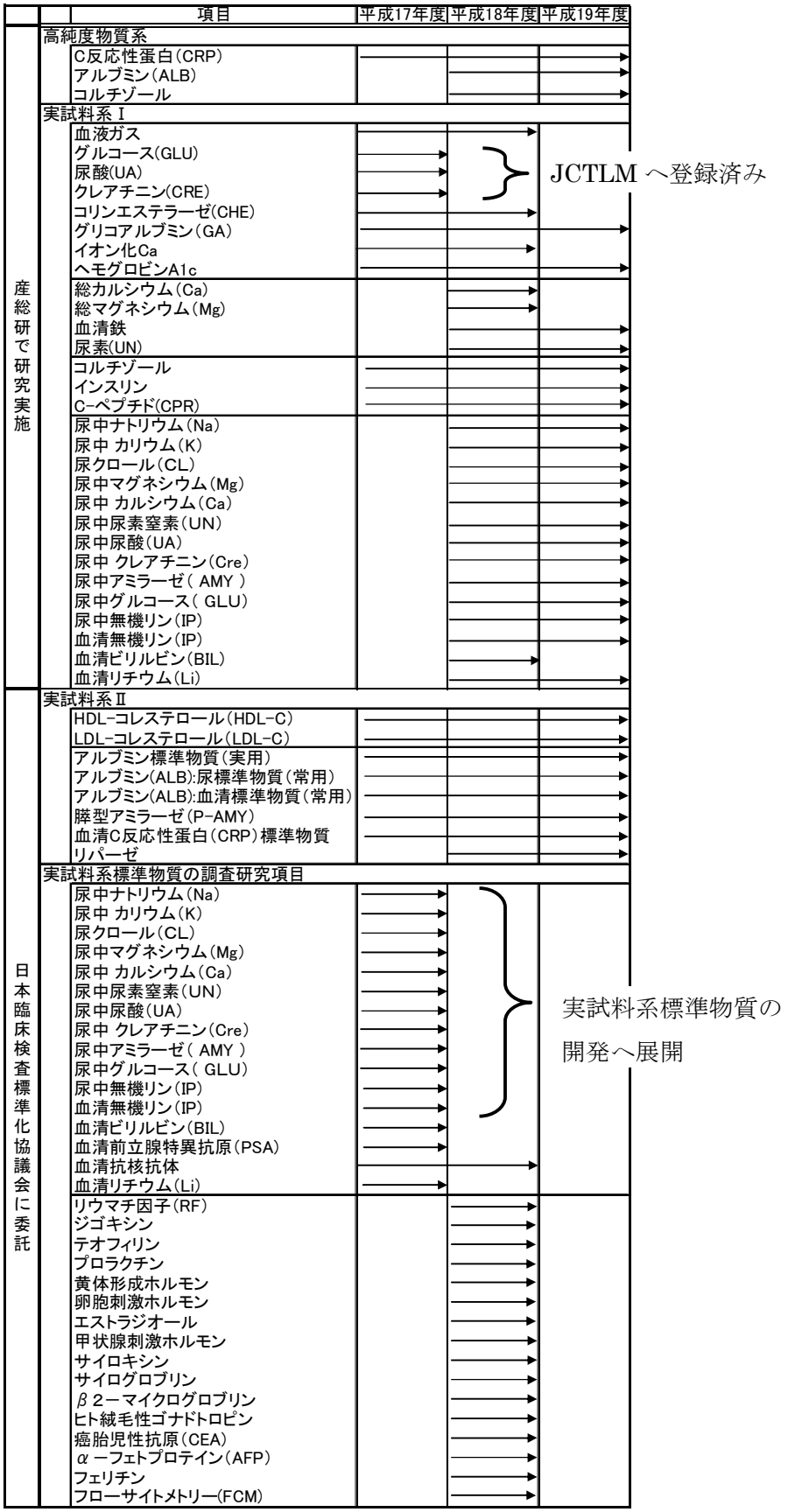
標準化基本検討委員会では、本委託事業において研究開発するメーカー標準品、実試料系標準物質あるいは純物質系標準物質を現場レベルの臨床検査室から国家計量標準までのトレーサビリティ連鎖の各段階で活用できるようにするため、実試料系および純物質系標準物質の各開発および調査研究の方向性を検討し、進捗状況を報告・審議し、最終的に開発したものの妥当性を審議することを責務としている。

本委託事業で研究する純物質系標準物質開発と実試料系標準物質開発を統括するとともに、それらを結びつけるための活動、また、実際にユーザーに供給される試薬メーカーレベルの標準物質までのトレーサビリティの構築を行うとともに、専門家や標準物質のユーザーなどの意見をとりまとめ、よりよい標準物質開発に反映させる。また、開発した標準物質について、国際的な認知を受けるため、「検査医学におけるトレーサビリティに関する合同委員会 (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine: JCTLM)」の標準物質データベースへのノミネーション作業を行う。

２－１－２　活動総括

平成 19 年 4 月 23 日に第 1 回委員会を開催し、各研究実行グループからの昨年度までの研究報告および研究計画の提案を受けて、今年度も引き続きこれまでの体制で研究を実施することを決定した。また、平成 20 年 1 月 17 日に第 2 回委員会を開催し、標準物質開の進捗状況の報告を行うとともに、研究のまとめおよび今後の方針についての議論を行った。本事業が、実際の標準物質開発のみならず、トレーサビリティ概念の普及という面からも大きな役割を果たしたとの指摘があり、今後も何らかの形で是非継続をしていただきたいとの委員長のコメントで締めくくられた。

表 3　平成 19 年度開発研究計画



２－２　実試料系標準物質の研究開発

２－２－１　総括

１．研究の進め方

実試料系標準物質の研究開発は、学協会の専門委員会での作業との連携による方法ならびに標準化基本検討委員会の中に設置ワーキンググループ(WG)による方法で行った

このうち日本臨床化学会（JSCC）の専門員会と連携した測定項目は、グリコアルブミン、ヘモグロビン A1c (HbA1c)、アルブミン、膵型アミラーゼ、血清 C 反応性蛋白(CRP)、リパーゼおよび血清リチウム(Li)である。また、日本臨床検査標準協議会（JCCLS）の標準物質小委員会との連携した測定項目は、ヘモグロビン A1c(HbA1c)である。

標準化基本検討委員会を設置し、検討のための WG を関連の学協会との協力で組織した測定項目は、インスリン、C-ペプチド、コルチゾール、HDL コレステロール、LDL コレステロールおよびアルブミンである。

また、本研究で得たプロトタイプから設定したヘモグロビン A1c (HbA1c)、HDL コレステロールおよび LDL コレステロール測定用の実試料標準物質については、(財）機械システム振興協会による平成 19 年度受託事業「臨床検査用自動分析装置における自動校正システムの開発に関するフィージビリティスタディ」において、自動分析装置の校正試料として用いた。さらに、平成 19 年度の本研究において、ヘモグロビン A1c (HbA1c)、HDL コレステロールおよび LDL コレステロールについての試薬キットを用いた自動分析装置による互換性評価試験については、(財）機械システム振興協会による平成 19 年度受託事業「臨床検査用自動分析装置における自動校正システムの開発に関するフィージビリティスタディ」の成果を参考にした。

なお、実試料標準物質のプロトタイプの調整あるいは作製については、有限責任中間法人 HECTEF スタンダードレファレンスセンター（現有限責任中間法人検査医学標準物質機構、ReCCS)、旭化成ファーマ㈱、シスメックス㈱およびオリエンタル酵母工業㈱の協力を得た。

２．結果のまとめ

実試料系標準物質の研究開発の結果は以下のごとくである。

（１）グリコアルブミン

１）設定したグリコアルブミン測定の JSCC 基準測定法により、血清標準物質の認証値とその不確かさを求めた。その結果、本血清標準物質の認証値は、レベル１および２についてそれぞれ 258 ± 8 mmol/mol、471 ± 13　mmol/mol となった。

２）本血清標準物質のコミュータビリティについて検討した。その結果、コミュータビリティの評価には NCCLS のガイドラインを参考にし、Passing–Bablok の直線回帰式を適用したところ、グリコアルブミンの日常検査法（単位は%であるが、図２では比較のためそれを 10 倍して mmol/mol として示す）との関係において、標準物質と実試料の回帰式は同じであり、かつ標準物質のばらつきは、実試料のばらつきの 95%信頼区間にはいっており、本標準物質にはコミュータビリティがあることが確認できた。

（2）ヘモグロビン A1c（HbA1c）

1）標準物質に必須のコミュータビリティの評価を行った。

2）ADA、EASD、IDF および IFCC の国際学術 4 団体による HbA1c のトレーサビティ体系と HbA1c の単位に関するコンセンサス・ステートメントが出されたことから、それに合致した標準物質の設定を行った。

3）上記ステートメントに合致した標準物質の開発において、IFCC レファレンス法による測定値と、JDS 校正 KO500 法による JDS 値との関係式を設定した。

4）上記ステートメントでは、米国の HbA1c に関する標準化機構である NGSP にトレーサブルな値と、IFCC 値との関係式を設定しており、IFCC 値を求めればその関係式（IFCC-NGSP 換算式）によって NGSP 値が得られる。それを換算 NGSP 値として、IFCC 値とともに報告するように求めている（IFCC 値の単位は mmol/mol であり換算 NGSP 値の単位は％である）。すなわち、IFCC 値、換算 NGSP 値、および、JDS 値の 3 つが存在することになる。この 3 つが問題なく整合するか否かについて、作製した標準物質を用いて検証した。

（3）血清鉄

1）国際的に評価の得られた認証標準物質がないため、ICSH 国際標準法の妥当性を評価する実験を行った。その結果、国際標準法での除タンパク処理の容積置換による濃縮誤差は、いずれも約 5 %であった。しかし、測定する血清中のタンパク濃度によってはこの値は変化する。また、除タンパク処理での血清の希釈倍数を 8 倍以上に高めれば、血清鉄濃度が 100 μg/dL 以下の検体では測定する吸光度が 0.01 以下に低下して、十分な測定精度が得られないことから、国際標準法の除タンパク処理での容積置換による濃縮誤差を回避する方法としては、標準添加法で測定する方法が最も妥当であるとした。

2）作製した標準物質について、保存安定性およびコミュータビリティ評価を行った。その結果、レベル 1 およびレベル 2 について、それぞれ 8.87 ± 0.32 μmol/L 、21.50 ± 0.48 μmol/L となった。また、保存安定性試は－70 ℃、－20 ℃保存条件で行った結果、対照として－120 ℃保存品を同時に血清鉄の日常検査法で測定したところ、－70 ℃保存においては 10 ヶ月間まで対照品との測定値の差はみられず安定であることが確認できた。また、－20℃保管品は 3 ヶ月間まで対照品との測定値の差みられず安定であったが、4 ヶ月間で対照品よりも 2%ほど高値となった。

（4）尿素窒素

1）作製した標準物質について、保存安定性およびコミュータビリティの評価を行った。

2）本標準物質を解凍し、室温（25±2 ℃）での安定性試験を行った。その結果、室温で 1、3、6 時間放置したものと－70 ℃保存品との測定値の差はみられなかった。従って、解凍した本標準物質は室温で 6 時間安定であった。

3）保存安定性試験は－70℃、－20℃保存条件で行った。その結果、－70℃保存においては 10 ヶ月間まで対照品との測定値の差はみられず安定であることが確認できた。また - 20℃保管

品も 10 ヶ月間まで対照品との測定値の差みられず安定であったが、血清の濁りが増加していており日常検査法の種類によっては測定値に影響が出る恐れがある。これらの結果より、本標準物質の保存期限は－70℃保存で 9 ヶ月間、 - 20℃保存で 6 ヶ月間とした。

（5）インスリン

1）血清中のインスリン測定について、平成 18 年度の共同実験にて、実試料系標準物質がデータの収束性に有効性であることが示唆された。

2）実試料標準物質候補品での収束性を再確認する目的で、標準物質候補品として試料を作製し、あわせて健常人血清を測定した。

3）現在の市販試薬では 1 キットを除くと血清値は収束していることが再確認された。

4）血清測定値と実試料標準測定値と挙動が異なる試薬が確認されている為、実試料標準物質としてトレーサビリティが認められる 2 試薬を用い、各試薬の校正を実施した結果、その優位性はなく、各試薬共に収束性が確認された。

5）試作した実試料標準物質が常用標準物質としてその有用性が実証できた。

（6）C-ペプチド

1）血清中の C-ペプチド測定について、平成 18 年度の共同実験にて、実試料系標準物質がデータの収束性に有効性であることが示唆された。

2）実試料標準物質候補品での収束性を再確認する目的で、標準物質候補品として患者プール血清試料を作製し、あわせて健常人血清を測定した。

3）現在の市販試薬では血清値は収束していることが再確認された。

4）実試料標準物質としてトレーサビリティが認められる 5 試薬を用い、各試薬の校正を実施した結果、前回同様の収束性が確認された。

5）試作した実試料標準物質が常用標準物質としてその有用性が実証できた。

（7）コルチゾール

1）共同実験により値付けしたプール血清を用いることで、実試料標準物質候補品としてデータ収束の有効な手段となりうるか検証した。

2）コルチゾールパネル血清表示値と各社の実測値で相関（傾きおよび相関係数）がもっとも良好の試薬を用いプール血清の値付けを行う。

3）値付けされたプール血清と各社キットの実測値を用い、各社キットの換算係数を求める。

4）求められた換算係数を用い、パネル血清実測値を換算することでデータ収束の可能性を検討した。

（8）HDL コレステロール、血清 LDL コレステロール

1）血清 HDL コレステロール（HDL-C）、血清 LDL コレステロール（LDL-C）の測定において、市販試薬のデータの収束性を可能にするため平成 17 年度、18 年度の検討結果に基づいて、

新鮮ヒトプール血清による効果の確認および作製方法について検討した。

2）直接法試薬を製造している6社を中心に新鮮ヒトプール血清10種類を作製し、収束性の検討、使用した各血清の性状、安定性についても併せて調査し実試料標準物質候補品の性状規格（案）、試料調製方法（案）を設定した。作製した試料の電気泳動パターンを確認して用いることで、収束性が向上する試料の作製の可能性が示唆された。

3）実試料標準物質の候補品の性状規格（案）の中で最も重要なのは電気泳動パターンが正常であるということであり、絶対条件である。HDL-C、LDL-Cはともにリポ蛋白中に存在するコレステロールであり、そのリポ蛋白の状態等により測定試薬の反応性が大きく変わる場合があるので、試料作製の際の選別およびその後の保管には細心の注意が必要である。

4）上記の検討結果より、目的の候補品の作製方法、性状規格（案）についてのガイドラインを提示することができたが、新鮮なヒト血清の入手にはボランティアの協力が必要であるために現実的には小グループでの使用に限定される。

今後、これら実試料タイプの標準物質の作製に際しての大きな課題として、新鮮なヒト血清の入手ルートの確立、が先ず必要である。

（9）測定用常用参照および実用血清標準物質（アルブミン）

1）ヒト血清アルブミンから高純度に分離精製した単量体アルブミンを原料にして試作された2種類の臨床検査用アルブミン標準物質（常用参照標準物質、血清用実用用標準物質）を用いて、市販測定キットの測定特性を検討した。

2）常用参照標準物質については、その下位に位置する血清用実用標準物質から試薬校正物質（市販キット添付校正物質）への値のトランスファーラビリティを確認することができた。

3）今回作製した常用参照標準物質および血清実用標準物質を用いたトレーサビリティ連鎖が成立しない原因が日常検査法のアルブミンに対する反応特異性に起因することが確認できた。

4）改良BCP法はアルブミン特異性の高く、本法を採用すればトレーサビリティ連鎖確保の可能性が示唆された。

5）一次基準測定法にはアルブミン水解アミノ酸の同位体希釈質量分析法、常用基準測定法にはHPLC-BCG法によるトレーサビリティ連鎖を構築する可能性を確認した。

（10）アルブミン常用基準測定法

1）血清アルブミン測定の常用基準法設定はHPLC法を基本とし、分離後のアルブミン検出法について主に検討を行った。紫外部吸収法（280 nm）、蛍光法（励起波長285nm、蛍光波長340 nm）、ポストカラム発色法（BCG発色）の3法について行ったが、ネフェロメトリー法との予備相関からBCG発色法を常用基準法試案（HPLC-BCG法）として選定した。

2）HPLC-BCG発色法とネフェロメトリー法との予備相関において、正の切片が認められたが、使用したBCG試薬に起因した切片であることが明らかとなった。移動相とBCG試薬を等量混合し発色液とした際に、血清の希釈試験が原点を通る直線となるように界面活性剤を増量した処方とした。また、アルブミンとグロブリンの分離能を向上させるためにカラム長を 20 cm

（10 cm×２本）とした。

3）最終的にネフェロメトリー法との相関性を調べたところ、極めて良好な相関関係が得られ、透析患者や高ビリルビン血清における乖離例も認められなかった。しかし、普遍性の検討では施設差が比較的大きく、さらに測定プロトコルを見なおす必要があった。

4）HPLC-BCG 法を対照に日常検査法の評価を行ったところ、BCG 法および BCP 法は測定法の問題点からトレーサブル連鎖が成立しなかった。連鎖が確保できる可能性があった測定法は改良 BCP 法であった。

5）JCCLS 試作の実用標準物質との反応性は、日常検査法では改良 BCP 法においても患者血清とは若干異なった。また、メーカー差も認められた。

（11）尿アルブミン

1）尿アルブミン常用標準物質の品質規格を策定した。

2）策定した品質規格に適合した尿アルブミン常用標準物質を作製した。

3）本常用標準物質の値付けは、CRM470 を上位標準物質として実施する。

（12）膵型アミラーゼ

1）膵型アミラーゼ活性測定の常用基準法設定の基本方針は、抗ヒト S-AMY 抗体を用いて S 型アミラーゼ活性を阻害した後、残存した膵アミラーゼの活性を総アミラーゼ活性測定 JSCC 勧告法で行うことを基本とした。

2）２社、4 種類の抗ヒト S-AMY 抗体による S-AMY 活性阻害条件の検討を実施し、P-AMY 活性に全く影響なく、S-AMY 活性を 95%以上阻害する条件を確立した。

3）抗ヒト S-AMY 抗体は被検体に予め添加処理するのではなく、アミラーゼ活性測定試薬を添加する方法とした。

4）JC・ERM（Lot 005）は、膵型 AMY 活性測定の常用標準物質として使用できることが確認できた。

5）膵型アミラーゼの基準範囲が設定できた。

（13）血清 C-反応性蛋白(CRP)

1）ヒト CRP 遺伝子を大腸菌に組み込み、リコンビナントヒト CRP（ｒCRP）を作製し、高品質の CRP 供給体制を確立した。

2）ｒCRP の物理化学的性質は天然の血清ヒト CRP と同等であった。

3）ｒCRP を用いてヒト CRP の常用参照標準物質および実用標準物質を作製した。

4）常用参照標準物質および実用標準物質の候補品の標準物質としての性能を評価した結果、両候補品とも十分な性能を有していることが確認された。

5）常用参照標準物質および実用標準物質の規格を作成し、候補品を評価の結果、両者とも規格を満たしていた。

6）CRM470 を基準に作成されている各社標準物質によりキャリブレーションを行い患者血清を測

定した場合の相関係数は r=0.998～1.000、CRP 標準物質候補品を用いてによりキャリブレーションを行って患者血清を測定した場合の相関係数は r=0.998～1.000 と、CRM470 の結果を得られることが確認できた。

（14）リパーゼ

1）日本臨床化学会リパーゼプロジェクト委員会では、血清リパーゼ活性測定の標準化を目的として、JSCC 常用基準法を設定するための作業を行い、JSCC 常用基準法（案）を準備することができた。そこで、本常用基準法（案）を用いて、標準物質候補品の酵素標準物質（JC-ERM：Lot 005）とヒト血清との反応性試験を行った結果、JC-ERM はヒト血清との反応性が異なった。

2）この原因を究明するため、ヒト血清の反応タイムコースを調べた結果、検体と試薬の反応過程において、白濁が生じて反応タイムコースがやや曲がることが確認された。そこで、この現象を回避するために、第一試薬にも硫酸マグネシウムを添加し、第一反応でグリセロールを消去する方法に、JSCC 常用基準法（案）を改良した。

3）そこで、今回、この改良 JSCC 常用基準法（案）を用いて、再度、標準物質候補品の酵素標準物質（JC-ERM：Lot 005）とヒト血清との反応性試験および酵素標準物質の標準値の値付けを行うための普遍性試験を行った。

4）その結果、JC-ERM とヒト血清の反応性は、相対残差で最大 13 %以内で一致することが確認できた。しかし、普遍性試験では、この改良 JSCC 常用基準法（案）においても、ヒトプール検体で白濁が生じて反応タイムコースがやや曲がる検体が認められた。そこで、この原因を究明することが、今後の課題となった。

（15）尿中電解質成分

1）平成 18 年度の活動において作成した尿電解質成分の常用参照標準物質候補品の安定性試験を実施した。

2）安定性試験において 13ヶ月まで安定であることを確認し、常用参照標準物質として位置づけられることを確認した。

3）本研究により尿電解質成分（Na、K、Cl）の常用参照標準物質としての有用性が確認された。

（16）尿中生化学成分

4）平成 18 年度の活動において作成した尿中生化学成分の常用参照標準物質候補品（アミラーゼを除く）の安定性試験を実施した。

5）安定性試験において 13ヶ月まで安定であることを確認し、常用参照標準物質として位置づけられることを確認した。

6）本研究により尿用のカルシウム・マグネシウム・尿酸・尿素窒素・グルコース・クレアチニン、無機リンの常用参照標準物質としての有用性が確認された。

（17）尿中アミラーゼ

1）平成 18 年度の活動において、P 型アイソザイムをヒト天然型に変更した処方にてプレ試験を実施し、収束性が見られたので、各メーカー使用のキャリブレータ、コントロールおよび検体も含めて各メーカー試薬と組み合わせた場合の測定値収束性の効果を調査した。測定値収束性の効果判定方法は各社の測定プロトコルに従い患者尿 25 例を測定した。その際、血清用常用参照物質（JCCLS CRM-001a）も検体として測定した。

2）その結果、プレ試験の結果が再現されず再検討が必要と考えられた。ただし、同一処方の試薬間、同一基質の試薬間においてかなりの乖離が見られたこと、プレ試験の検討において乖離が見られない試薬間においても問題があることから、検体の安定性、遠心分離を含む前処理も問題等標準物質では説明出来ない問題もあることが判明し今後の課題となった。

（18）血清無機リン

1）平成 18 年度の活動において作成した血清無機リンの常用参照標準物質候補品の安定性試験を実施した。

2）安定性試験において 13 ヶ月まで安定であることを確認し、常用参照標準物質として位置づけられることを確認した。

3）本研究により血清無機リンの常用参照標準物質としての有用性が確認された。

（19）血清リチウム(Li)

1）実試料標準物質候補品のプロトコルの作成を目的とする研究を実施した。

2）平成 18 年度までのまとめ：血清リチウムについては、国内各種サーベイランスの対象になっていないことから、具体的な互換性について認識がない。実試料標準物質候補品(3 水準)を用いて検証実験を行い、有用性を再確認した。

3）今年度は実試料標準物質候補品の安定性を確認した。

4）昨年度作成した実試料標準物質候補品を冷凍保存し、WG 参加メーカーで測定した。測定方法は、電極法、色素法である。

5）冷凍保存で、１年間の安定性が確認できた。

6）実試料標準物質候補品の確立ができたと考えられた。

（20）HDL コレステロール、血清 LDL コレステロール測定用血清標準物質

1）HDL コレステロールおよび LDL コレステロール測定用血清標準物質を作製した。

2）本血清標準物質のベース血清は、NCCLS（現 CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute）のドキュメント（CA37-A）による調製ならびにバリデーション(validation：妥当性確認)の方法にしたがってヒト新鮮血清を用いて調製し、さらに日常検査法でコミュータビリティ(commutability：互換性)のあることを確認した。

3）HDL-C および LDL-C の値付けは、CDC（Center for Disease Control and Prevention:アメリカ疾病予防センター）のレファレンス法によった。

４）値付けの作業は、国際 3 機関（アメリカのワシントン大学ノースウエスト脂質代謝・糖尿病研究所、カナダのカナダ外部精度評価研究所、日本の（有限責任中間法人）検査医学標準物質機構（ReCCS)による共同実験によった。

５）本血清標準物質を、現状の LDL-C 測定の直接法である日常検査法に適用した場合の予備的な結果は、直接法 11 キットについて、本血清標準物質を測定試料として直接測定したところ、測定値の相対バイアスの大きさは順に-7.2%、-5.7%、-4.1%,-2.6%、-2.3%、-1.8%（3 キット)、-1.1%、0.5%、2.0%であった。±5%以内がキットの許容限界とすると、9 キットはメーカーでの標準測定操作法を介さなくても精確さが維持されていた。

６）本血清標準物質は、メーカーの基準とする測定操作法の親として用いるが、最終的な精確さの伝達は、メーカーのキットの添付文書に従う。

３．今後の課題

実試料標準物質の研究開発についての今後の課題は以下のごとくである。

（１）国際標準化への対応

１）実試料標準物質について、値付けの方法、認証書および取扱説明書が作成し、かつこれらの文書の英文化を行い､国際標準化のために JCTLM ノミネーションの準備ができる測定項目はＨＤＬコレステロールおよび LDL コレステロールであり、次回の Cycle の JCTLM ノミネーションを準備する。

２）本研究開発で実試料標準物質の設定が今後可能な測定項目は、グリコアルブミン、インスリン、C-ペプチド、コルチゾールである。このうちグリコアルブミンについては、JCTLM へのノミネーションを予定する。

２－３　純物質系標準物質の研究開発

要旨

１）C 反応性蛋白標準物質については、値付けを実施し、標準物質を完成させた。

２）アルブミン標準物質については値付けのための測定法としてのアミノ酸分析法を確立した。また、標準物質開発に向けての課題の抽出を行った。

３）コルチゾール標準物質に関しては、値付けの基準とする高純度標準物質を開発し、不純物の同定定量からの値付け法を確立した。また、供給に必要な量を確保できる純度の高い候補品を開発し、高純度標準物質からの値付け技術として同位体希釈質量分析法を確立した。

２－３－１　研究背景

産業技術総合研究所計量標準総合センターでは、定量分析の基準となる標準物質の開発を進めており、臨床検査分野についても、トレーサビリティ体系の最上位の位置づけを担う純物質系標準物質として、コレステロール、クレアチニン、尿素等の標準物質開発を行ってきた。これらの低分子の有機化合物については、国際度量衡委員会／物質量諮問委員会(CIPM/CCQM)で定義されている一次標準測定法によりトレーサビリティの確保されうる測定系の構築が可能であると考えられるが、現実には化合物ごとに適用可能な手法が限られるため、実際の開発に当たっては物質ごとに値付けの方法を選定し、決定していく必要がある。特に、臨床検査分野で測定対象である代謝物に代表される低分子の有機化合物は、熱的に不安定で、類似の化合物からの分離が困難等の化合物が多いため、標準物質開発における値付け方法に関しても十分な検討が必要である。一方、蛋白質などの生体高分子については、国際単位系（SI）トレーサブルな測定系を確立していくことが必要とされている。現状の一次標準測定法は蛋白質には直接的には適用できないため、SI トレーサブルといえる蛋白質標準物質は世界的にもまだほとんど例がなく、CIPM/CCQM においても、蛋白質の SI トレーサブルな定量方法に関する議論が行われているところである。

本研究では、C 反応性蛋白(CRP)、アルブミン、およびコルチゾールに関しての純物質系標準物質の開発を目指している。CRP およびアルブミンについては、蛋白質における国際単位系（SI）トレーサブルな測定体系について検討するとともに、それらを用いた純物質系標準物質の開発を目標にした。平成 19 年度は、CRP については、これまでの検討結果を踏まえて、値付けの方法を決定し、標準物質作製を行った。アルブミンに関しては、ヒト血清アルブミンについての修飾や夾雑蛋白質等の解析を実施し、候補品に必要な品質を明らかにするとともに、測定法を確立して SI トレーサブルな値付けを可能にすることを目指した。また、コルチゾールに関しては、一次標準測定法の直接的な適用が困難であることが明らかになったため、少量の高純度物質を基準として実際の供給品を値付けるスキーム、すなわち、基準とする高純度物質の調製と純度決定方法とそれに基づく実際の供給候補品の値付け方法の確立を行い、標準物質の値付けスキームとしての実用性についての評価を行った。

２－４　実試料系標準物質の調査研究

２－４－１　総　括

１．調査研究の進め方

平成17年度および18年度に検討した項目の中で、継続検討および文献調査群により標準物質候補品が作製可能な項目を表１のごとく選び、項目群ワーキンググループ(WG)を設けて活動した。

表１　項目群ワーキンググループ一覧表

WG 名	項　　目
C3	血清抗核抗体(ANA)、RF
C5	黄体形成ホルモン(LH)､卵胞刺激ホルモン(FSH)、エストラジオール(E2)
C6	フリーT4(FT4)
C8	FDP、D ダイマー
C9	β２－マイクログロブリン

平成17年度および18年度と同様に、実効計画書を作成して、検証実験を行った。

＊実行計画書の考え方＊

①各項目を基準１・基準２で調査し分類する。

基準１：公的標準物質（NIST・WHOなど）の調査

基準２：純物質・精製物質の入手の可・否の調査

⇩

［標準物質候補品が作製可能な場合］

⇩

②標準物質候補品を作製

③標準物質候補品の評価

実試料（患者血清・患者尿　など）を用い反応性の確認を行う。

２．結果

調査により標準物質候補品の検討継続および作製可能と判断した項目は、RF・抗核抗体・E2・FSH・LH・FT４・FDP・D ダイマーおよびβ２マイクログロブリンである。これらについて標準物質候補品を作製し、、検証実験を行い、以下のごとくの結果を得た。

１）RF：健常者試料を収集することでカットオフ値を設定することができた。これにより健常者試料の特性条件を作成することができた。また、カットオフ根の維持のためのパネル血清の特性条件を作成することができた。

2）抗核抗体：患者検体・健常検査体において HEPASERA-1 による補正で力価や陽性率において試薬間差が小さくなった。今後、標準品の作製場所・使用方法・染色型判別法ガイドラインなどの標準測定法の検討が必要である。

3）E2：平成 18 年度において用いた試料について、ID-LC/MS 法で値付けした結果、ヒトプール血清（抗原未添加）による収束性が確認できた。

4）LH、FSH：WHO 標準物質添加標準品を上位標準品とし、マトリックスの影響が少ない複数の市販キットで、ヒトプール血清（抗原未添加）に値付けした標準物質が有効であると判断した。

5）FT4：ヒトプール血清（抗原未添加）で収束性が確認できた。

6）FDP、Dダイマー：低分子フィブリン分解物を添加しない高分子フィブリン分解産物の標準品で、収束性が確認できた。

7）β２-マイクログロブリン：リコンビナント抗原系標準物質に比し、天然抗原（血清ベース）で収束性が確認できた。ERM-DA470 は、リコンビナント抗原が添加されていることから、本標品での各社のキットの反応性について検討課題である。

３．今後の課題

平成17年度および18年度で標準物質が作成可能と判断した項目について、実験計画書および標準物質候補品を作製し、検証実験を行った。このうちE2、LH、FSH、FT4、β２-マイクログロブリンについては、プール血清（抗原未添加）が有効という結果となった。しかし、プｒール血清の作製にあたり、血清の選択条件、性状、保存方法など今後解決する必要がある加課題が多くある。

標準物質候補品の反応性評価試験に必要な実試料（健常人血清・患者血清など）の入手は、従来通り時間を要した。今後、プール血清を作製するに当たっても、入手先の倫理委員会の許可が必要となれば、迅速な作製・検討などが困難になるため、別途、実試料の入手方法の設定が必要である。